

مقایسه روش های معمول باکتریولوژیک با روش واکنش زنجیره ای

پلی مرز (PCR) در تشخیص سریع مننژیت سلی

دکتر محمد یوسف علیخانی^۱، محمد مهدی اصلانی^۲، دکتر هادی پیری دوگانه^۳، دکتر محمد حسین دهقان^۴

^۱ نویسنده مسئول: استاد یار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان E-mail: alikhani43@yahoo.com

^۲ استادیار گروه میکروب شناسی ^۳ استادیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

چکیده

زمینه و هدف: بیماری سل در کشورهای در حال توسعه شیوع بالایی داشته و میزان مرگ و میر ناشی از مننژیت سلی، قویا در ارتباط با تاخیر در تشخیص و درمان می باشد. واکنش زنجیره ای پلی مرز (Polymerase Chain Reaction) PCR به عنوان یک ابزار تشخیصی برای شناسایی بیماری سل استفاده شده است. حصول سریع نتایج و حساسیت بالاتر PCR در مقایسه با روش های معمول باکتریولوژیک موجب شده که PCR روش مناسبی در تشخیص بیماری سل، بویژه در مننژیت سلی، در مواردیکه که تشخیص مشکل است و یا تشخیص سریع مورد نیاز است باشد. اگرچه، احتمال نتایج مثبت و منفی کاذب را باید مورد توجه قرار داد. هدف از انجام این مطالعه مقایسه روش PCR با روش های معمول باکتریولوژیک (کشت و رنگ آمیزی ذیل-نلسون) برای شناسایی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در نمونه های مایع مغزی نخاعی (Cerebro Spinal Fluid) CSF بیماران مشکوک به مننژیت سلی بوده است.

روش کار: تعداد ۲۵ بیمار که از نظر بالینی و بر اساس علایم کلینیکی و یافته های بیوشیمیایی به عنوان مننژیت سلی تشخیص احتمالی داده شده بودند و ۱۰ بیمار مشکوک به مننژیت ویرال و یا مننژیت ناشی از دیگر باکتری ها غیر از مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. بر روی نمونه های ارسالی بعد از انجام آزمایشات روتین باکتریولوژی (تپیه اسمیر مستقیم و کشت)، DNA Extraction و سپس آزمایش PCR بصورت NESTED OLIGO انجام گرفت و نتایج بدست آمده با هر سه روش مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: از ۲۵ نمونه جمع آوری شده، PCR در ۹ مورد (۳۶٪) DNA مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را در نمونه های CSF شناسایی نمود (طی دوبار تکرار آزمایش روی نمونه با PCR)، در حالیکه کشت تنها در ۲ مورد (۸٪) و لام مستقیم با رنگ آمیزی ذیل نلسون در یک مورد (۴٪) مثبت بودند. در ضمن هیچیک از ۱۰ نمونه CSF که مشکوک به مننژیت های ویرال و یا مننژیت ناشی از دیگر باکتری ها بودند با روش PCR نتیجه مثبت نشان ندادند.

نتیجه گیری: نتایج فوق نشان می دهد که روش PCR یک روش حساس و سریع در تشخیص مننژیت سلی است، بطوری که زمان بدست آوردن نتایج را از چندین هفته با روش های روتین باکتریولوژیک به یک تا دو روز خصوصا در بیماران اسمیر منفی کاهش می دهد. این امر در بیماری مننژیت سلی که یک اورژانس پزشکی محسوب می گردد و نیاز به تشخیص سریع و شروع فوری درمان دارد بسیار حایز اهمیت می باشد.

واژه های کلیدی: توبرکولوزیس، تشخیص سریع، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، مننژیت سلی

پذیرش: ۸۶/۵/۲۷

دریافت: ۸۶/۱/۲۰

مقدمه

توبرکولوزیس خارج ریوی است که در ۷-۱۲ درصد بیماران سلی در کشور های در حال توسعه اتفاق می افتد [۲]. بدلیل تظاهرات بالینی غیر اختصاصی و

بیماری سل عامل بیش از دو میلیون مرگ و میر در دنیا می باشد [۱]. مننژیت سلی خطرناک ترین فرم

فقدان تست آزمایشگاهی سریع، حساس و اختصاصی، تشخیص این بیماری مشکل بوده و علی رغم دسترسی به شیمی درمانی مؤثر میزان مرگ و میر بیماری بالا می باشد. تاخیر در تشخیص ارتباط مستقیم با نتیجه بیماری دارد، بطوری که در ۲۵-۲۰ درصد بیمارانی که سریعاً تحت درمان قرار نمی گیرند عوارض نورولوژیک ظاهری می گردد [۴،۳]. متد های متداول باکتریولوژیک برای تشخیص سریع مننژیت سلی مناسب نیستند زیرا تعداد کم باکتری در نمونه مایع مغزی نخاعی^۱ مانع از تشخیص بوسیله روش اسمیر مستقیم بوده و حساسیت و ویژگی این روش بسیار متغیر گزارش می گردد [۵]. تعیین باکتری از طریق کشت به دلیل رشد آرام باکتری به ۸-۶ هفته زمان نیاز دارد و معمولاً نتایج منفی کاذب حاصل می گردد [۶]. مننژیت سلی جزء موارد اورژانس پزشکی محسوب می شود و تشخیص بیماری در مراحل اولیه حیاتی می باشد و اغلب بصورت احتمالی و بر اساس یافته های بالینی تشخیص داده می شود. چندین روش مولکولی جدید برای تشخیص سریع مننژیت سلی توسعه یافته است [۸،۷]. حساسیت این روش ها بسیار متغیر و از ۳۳٪ [۹] تا ۹۰٪/۱۰ [۱۰] گزارش شده است. نقش PCR^۲ در تشخیص روتین مننژیت سلی نامشخص بوده و نیاز به ارزیابی های بیشتری دارد. در این مطالعه مقایسه بین روش Nested PCR و روش های معمول باکتریولوژیک (اسمیر مستقیم و کشت) در تشخیص مننژیت سلی بر روی نمونه های CSF مورد بررسی قرار گرفته است. مهمترین ویژگی روش Nested PCR حساسیت بیشتر آغازگرهای داخلی مورد استفاده می باشد.

روش کار

تعداد ۲۵ بیمار که از نظر بالینی و بر اساس علایم درمانگاهی و یافته های بیوشیمیایی به عنوان مننژیت سلی تشخیص احتمالی داده شده بودند و ۱۰ بیمار که

مبتلا به مننژیت ویرال و یا مشکوک به مننژیت ناشی از دیگر باکتری ها غیر از مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بودند در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. یک قسمت از نمونه جهت انجام آزمایشات روتین شامل کشت روی محیط لونشتاین جانشون (L.J) و تهیه گستره برای رنگ آمیزی ذیل نلسون مطابق روش های استاندارد [۱۱] و قسمت دیگر بمنظور انجام آزمایش PCR استفاده شد. برای استخراج DNA از روش جوشاندن در بافر TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM Na-EDTA, PH 8) استفاده گردید [۱۲]. بطور خلاصه، یک میلی لیتر از نمونه CSF را در بافر TE مخلوط نموده و بمدت ۱۵ دقیقه در آب جوش انکوبه، فریز کرده و مجدداً ذوب می شد. این عمل سه بار تکرار و نهایتاً در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی آن تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در این مطالعه از روش Nested PCR و از دو جفت آغازگر (آغازگرهای خارجی A,B و آغازگرهای داخلی C,D) به منظور تکثیر ناحیه ای اختصاصی از DNA مایکو باکتریوم توبرکولوزیس که کد کننده پروتئین MBP70^۳ می باشد استفاده گردید [۱۲]. این ناحیه ۴۹۲ جفت باز دارد که دو قطعه ۳۲۲bp و ۲۲۳bp جهت تکثیر مشخص و برای هر کدام از این قطعات یک جفت آغاز گر سنتز گردید. ترادف آغاز گر ها عبارت بودند از:

A:5'-GAA-TGT-CGC-AGG-ACC-CGG-TC-3' ،

B:5'-CTT-GAG-GCT-GTT-ACC-CTG-AC-3،

C:5'-CTC-AAT-CCG-CAA-GTA-AAC-CT-3' ،

D:5'-GTT-ACC-CTG-ACC-GGT-CAC-CG-3'

واکنش PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر انجام گرفت.

مخلوط واکنش حاوی KCL 50mmol/L، 2mmol/L

MgCL2، 10mmol/L Tris-HCL pH8.4، 0.2μmol

mol each dNTPs MIX (Fermentase Co)

0.2μ primers و 5ng/μ DNA(target) Taq DNA

polymerase (Fermentase Co) بود .

¹ Cerebro Spinal Fluid

² Polymerase Chain Reaction

³ Mycobacterium Protein 70

یافته ها

حساسیت و ویژگی PCR برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از DNA تعدادی از سایر گونه های مایکوباکتریوم و همین طور باکتری های دیگر مورد ارزیابی قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده جز با DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با هیچ نمونه دیگری واکنش مثبت نشان ندادند. حساسیت آغازگرهای خارجی با استفاده از رقت های سریال مطابق استاندارد مک فارلند، ۳۰ سلول در واکنش و حساسیت آغازگرهای داخلی برابر ۳ سلول در واکنش تعیین گردید. ۳۵ نمونه CSF از بیماران مشکوک به مننژیت با استفاده از روش های روتین باکتریولوژیک و Nested PCR مورد مطالعه قرار گرفت. اسمیر با رنگ آمیزی ذیل-نلسون تنها در یک مورد (۴٪) و کشت در ۲ مورد (۸٪) از نمونه های CSF از نظر وجود مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مثبت بودند. PCR اولیه بوسیله آغازگرهای خارجی ۴ مورد (۱۶٪) و با آغازگرهای داخلی ۹ مورد (۳۶٪) از نظر وجود DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مثبت بود (جدول ۱).

در ۱۰ نمونه CSF که مشکوک به مننژیت غیر سلی بودند، اسمیر مستقیم، کشت بر روی محیط لونشتاین جانشین و PCR منفی بود.

تکثیر بمیزان ۳۴ سیکل در ۹۴°C بمدت ۳۰ ثانیه، ۶۰°C بمدت ۹۰ ثانیه و ۷۲°C بمدت ۱۲۰ ثانیه با استفاده از دستگاه ترموسیکلر Ependorf انجام گرفت. یک کنترل منفی حاوی تمام مواد واکنش بجز DNA الگو و یک کنترل مثبت با الگوی شناخته شده (DNA استخراج شده از سویه استاندارد H37Rv مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) جهت سنجش کارآیی بافرها، آنزیم و شاخص های سیکل حرارتی [۱۳] و یک کنترل داخلی (کنترل تکثیر) حاوی آغازگرهای مربوط به ژن بتا گلوبین انسانی (۵۲۹ bp) در هر سری از واکنش ها استفاده می شد. هنگام استفاده از آغازگرهای داخلی از دمای اتصال ۵۲°C و غلظت ۴ میلی مولار کلرید منیزیم و از محصول واکنش اول (با آغازگرهای خارجی A,B) به عنوان DNA الگو استفاده می شد. بعد از تکثیر، ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی آغازگر ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفرورز و با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور آنالیز می گردید، بطوری که وجود باند با وزن مولکولی ۳۲۲ bp نشان گر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) در نمونه بود و در صورت عدم مشاهده باندی با وزن مولکولی فوق با استفاده از آغازگرهای داخلی (C,D) روی محصول واکنش اول، Nested PCR انجام می گرفت که در این حالت باند با وزن مولکولی ۲۲۳ bp مشخص کننده وجود MTB بود.

جدول ۱. مقایسه نتایج PCR، کشت و اسمیر مستقیم در بیماران مشکوک به مننژیت سلی و مننژیت غیر سلی

تعداد بیماران	تعداد	مثبت با کشت	مثبت با اسمیر	مثبت با PCR	مثبت با PCR
				Nested PCR	PCR اولیه
مننژیت سلی	۲۵	۲ (۸٪)	۱ (۴٪)	۴ (۱۶٪)	۹ (۳۶٪)
مننژیت غیر سلی	۱۰	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)

جدول ۲. نتایج PCR بیماران مشکوک به مننژیت سلی

تعداد نمونه ها	کشت مثبت	کشت منفی	کشت مثبت	کشت منفی	PCR منفی
اسمیر مثبت	۱ (۴٪)	۱ (۴٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)
اسمیر منفی	۲۴ (۹۶٪)	۲ (۸٪)	۶ (۲۴٪)	۰ (۰٪)	۱۶ (۶۴٪)

در مقایسه تمام نتایج در دو گروه اسمیر مثبت و اسمیر منفی، یک مورد (۴٪) از نمونه های اسمیر مثبت با PCR هم مثبت بود (۱۰۰٪) و در نمونه های اسمیر منفی، ۳ مورد (۱۲/۵٪) با PCR اولیه و ۹ مورد (۳۶٪) با استفاده از آغازگرهای داخلی از نظر وجود DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مثبت بود (جدول ۲).

از ۲۲ (۹۱/۶٪) نمونه CSF که با اسمیر مستقیم و کشت منفی بودند، ۶ مورد (۲۴٪) با استفاده از Nested PCR نتیجه مثبت نشان دادند. از ۲۵ نمونه CSF جمع آوری شده از بیماران مشکوک به مننژیت سلی، ۱۰ مورد (۴۰٪) با هر سه روش کشت، اسمیر مستقیم و PCR مثبت بود و ۲ مورد (۸٪) با کشت و PCR و ۶ مورد (۲۴٪) فقط با PCR مثبت بوده است (جدول ۲). بطور کلی میزان موارد مثبت با PCR تقریباً چهار برابر نسبت به موارد مثبت با کشت و ۹ برابر نسبت به رنگ آمیزی ذیل نلسون افزایش نشان می دهد.

بحث

این مطالعه نشان داد که PCR روش مفیدی برای تشخیص اختصاصی و سریع مننژیت سلی با کارایی بالاتر نسبت به روش های میکروسکوپی و کشت می باشد (جدول ۱).

دقت و صحت نتایج این مطالعه با نتیجه منفی که در تمام نمونه های بدست آمده از بیماران مشکوک به مننژیت غیر سلی حاصل گردید، نشان داده شده است. نتایج بدست آمده در نمونه های بیماران مشکوک به مننژیت سلی نشان می دهد که Nested PCR می تواند تمام نمونه های کشت مثبت را شناسایی کند که با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد [۱۵، ۱۴].

روش های بیولوژی مولکولی که قبلاً برای تشخیص سریع مننژیت سلی استفاده می شدند، پروب های DNA بود اما حساسیت رضایت بخشی نداشتند [۱۶].

PCR نسبت به پروب DNA دارای این مزیت است که DNA الگو چندین بار تکثیر می یابد. در این مطالعه PCR نسبت به روش های متداول باکتریولوژیک برای تشخیص مننژیت سلی حساسیت و

سرعت بیشتری داشت. روش های معمول فاقد حساسیت لازم و سرعت عمل می باشند، بطوری که کشت به مدت ۶ الی ۸ هفته زمان انکوباسیون نیاز دارد و اسمیر هم علی رغم سهولت و سرعت عمل از حساسیت و ویژگی پایینی برخوردار بوده و تنها جنس مایکوباکتریوم را شناسایی می نماید و همین طور باید حداقل 10^4 باکتری در یک میلی لیتر نمونه موجود باشد تا بتوان از طریق لام مستقیم نتیجه مثبت بدست آورد [۱۸، ۱۷].

در PCR میزان اختصاصی بودن روش بوسیله انتخاب ترادف تکثیر شده تحت تاثیر قرار می گیرد. در این بررسی یک قسمت از ژن کد کننده پروتئین MBP70 برای تکثیر انتخاب شد، زیرا این پروتئین برای مجموعه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اختصاصی است [۱۵، ۱۲].

از طرفی حساسیت روش با افزایش دفعات دستکاری نمونه ها ممکن است کاهش یابد، برای رفع این مشکل دستکاری قسمت کوچکی از نمونه در یک زمان و جمع آوری نمونه ها در دو حجم جداگانه، که یکی از آنها جهت مواقع ضروری ذخیره می گردد توصیه می شود. نتایج مثبت با PCR ممکن است که بوسیله آلودگی داخل و یا خارج آزمایشگاهی ایجاد گردد. در این تحقیق وجود آلودگی های وابسته به آزمایشگاه تقریباً با اطمینان رد می شود زیرا در تمام مراحل آزمایش از کنترل های مثبت و منفی استفاده می گردید. مهمترین ویژگی Nested PCR با استفاده از آغازگرهای داخلی افزایش حساسیت آن می باشد در این مطالعه همانند مطالعات دیگر [۱] Nested PCR در ۹ مورد (۳۶٪) در مقایسه با PCR اولیه (۱۶٪) DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را در نمونه های CSF شناسایی نمود.

نتیجه گیری

بطور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که ویژگی صد درصد برای روش PCR امکان پذیر می باشد و چنانچه از یک روش استاندارد جهت

استخراج DNA و کنترل آلودگی به موازات تمام
 مراحل PCR استفاده گردد، PCR روشی سریع و قابل
 اعتماد برای تشخیص مننژیت سلی در مقایسه با روش
 های باکتریولوژیک خواهد بود.

References

- 1- Brienze VM, Tonon AP, Pereira FT, Liso E, Tognola WA, Santos MA, Ferreira MU. Low sensitivity of polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculous meningitis in southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001 Jul-Aug;34(4):389-93.
- 2- Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, Prasad K, Behari M, Shriniwas, Ahuja GK. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet*. 1991 Jan 5;337(8732):5-7.
- 3- Molavi A, LeFrock JL. Tuberculous meningitis. *Med Clin North Am*. 1985 Mar;69(2):315-31
- 4- Thwaites GE, Caws M, Chau TT, Dung NT, Campbell JI, Phu NH, Hien TT, White NJ, Farrar JJ. Comparison of conventional bacteriology with nucleic acid amplification (amplified mycobacterium direct test) for diagnosis of tuberculous meningitis before and after inception of antituberculosis chemotherapy. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar; 42(3):996-1002.
- 5- Thwaites G, Chau TT, Mai NT, Drobniewski F, McAdam K, and Farrar J. Tuberculous meningitis. *J Neurol Neurosurg Psych*. 2000; 68:289-99.
- 6- Caws MS, Wilson M, Clough C, Drobniewski F. Role of IS6110-target PCR, culture, biochemical, clinical and immunological criteria for diagnosis of Tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol*. 2000 Sep; 38(9): 3150-5.
- 7- Daniel TM. New approaches to the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *J Infect Dis*. 1987 Apr; 155(4):599-602.
- 8- Daniel TM. Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory techniques applicable in developing countries. *Rev Infect Dis*. 1989 Mar-Apr; 11 Suppl 2:S471-8.
- 9- Nguyen LN, Kox LF, Pham LD, Kuijper S, Kolk AH. The potential contribution of the polymerase chain reaction to the diagnosis of tuberculous meningitis. *Archives of Neurology*. *Arch Neurol*. 1996 Aug; 53(8):771-6.
- 10- Liu PYF, Shi ZY, Lau YJ, Hu, BS. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol. *Neurology*. 1994; 44: 1161-1164.
- 11- Baron EJ, Finegold M. *Diagnostic microbiology*. Toronto: Mosby, 8th ed. 1990:363-85.
- 12- Bahramand AR, Malkov IG, Samar G, Saifi M. Differentiation of Mycobacterium Tuberculosis – Bovis complex from atypical Mycobacteria by PCR. *Iran Jour Medi Scien* 1994;19(344):82-87.
- 13- Brown TA. *Essential Molecular Biology (A practical approach)*. VOL (2); 1991:185-207.
- 14- Sritharan V, Barker RJ. A simple method for diagnosing M. tuberculosis infection in clinical samples using PCR. *Molec Cell Probes*. 1991; 5: 385-395.
- 15- Altamirano M, Kelly MT, Wong A, Bessuille ET, Black WA, Smith JA. Characterization of a DNA probe for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992 Aug;30(8):2173-6.
- 16- Grange JM. The rapid diagnosis of bacillary Tuberculosis. *Tubercle*. 1989; 70: 1-4.
- 17- Gordin F, Slutclin G. The validity of acid-fast smears in the diagnosis of Tuberculosis. *Arch Pathol Lab Med*. 1990; 114:1025-1027.
- 18- Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Apr; 8(2):180-99.